



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2011/2012

Rui Miguel da Silva Costa Lopes Gaspar
Marcadores moleculares do
adenocarcinoma do pulmão

março, 2012

FMUP

Rui Miguel da Silva Costa Lopes Gaspar
Marcadores moleculares do
adenocarcinoma do pulmão

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Anatomia Patológica

Trabalho efetuado sob a Orientação de:
Doutora Conceição Souto Moura

Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:
Revista da Sociedade Portuguesa de Pneumologia

março, 2012

FMUP

Nome: Rui Miguel da Silva Costa Lopes Gaspar, abaixo assinado

Endereço eletrónico: rui_99_@hotmail.com **Telefone ou Telemóvel:** 917095413

Número do Bilhete de Identidade: 13396086

Título da Monografia: Marcadores moleculares do adenocarcinoma do pulmão

Orientador: Doutora Conceição Souto Moura

Ano de conclusão: 2012

Designação da área do projeto: Anatomia Patológica

É autorizada a reprodução integral desta Monografia para efeitos de investigação e de divulgação pedagógica, em programas e projetos coordenados pela FMUP.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 19/3/2012

Assinatura: Rui Miguel Gaspar

Eu, Rui Miguel da Silva Costa Lopes Gaspar, abaixo assinado, nº mecanográfico 060801123, estudante do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 19/3/2012

Assinatura: Rui Miguel Gaspar

Marcadores moleculares do adenocarcinoma do pulmão

Rui Miguel da Silva Costa Lopes Gaspar (rui_99_@hotmail.com)

Doutora Conceição Souto Moura (moura.conceicao@gmail.com)

Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João

Índice:

Lista de abreviaturas e siglas.....pág. 3

Resumo a palavras-chave.....pág. 4

Introdução

- Adenocarcinoma do pulmão.....pág. 5

Marcadores moleculares.....pág. 6

- EGFR.....pág. 7
 - ✓ Diagnóstico.....pág.13
 - ✓ Tratamento.....pág. 14
- KRAS.....pág. 22
- ALK.....pág. 23
- HER2.....pág. 24
- BRAF.....pág. 25
- PIK3CA.....pág. 25
- FGFR4.....pág. 25
- MEK1.....pág. 26
- ROS.....pág. 26

Conclusão.....pág. 27

Bibliografia.....pág. 28

Resumo:

O carcinoma do pulmão é atualmente um problema de saúde pública, constituindo a principal causa de morte por cancro nos países ocidentais.

O carcinoma do pulmão de células não pequenas, representa cerca de 80% das neoplasias do pulmão, sendo o adenocarcinoma o subtipo histológico mais frequente.

Apesar de avanços na terapêutica, o prognóstico mantém-se reservado, pelo que se torna necessário esclarecer os mecanismos patogénicos envolvidos na carcinogénese dos carcinomas do pulmão.

Recentemente foram identificados marcadores moleculares associados ao adenocarcinoma do pulmão. O EGFR, em especial, tem sido um dos marcadores mais estudados, e foram descritas diversas mutações e terapias dirigidas contra este “alvo”. Entretanto foram descritas mutações adquiridas, designadamente no EGFR, responsáveis por resistência após resposta favorável a este tipo de (bio)terapia.

Neste trabalho apresenta-se uma revisão das principais vias moleculares envolvidas no adenocarcinoma do pulmão e das suas implicações prognósticas e terapêuticas.

Palavras chave: adenocarcinoma do pulmão; EGFR; KRAS; inibidores da tirosina-cinase; alvos moleculares; Unidade respiratória terminal; ALK; HER2; BRAF.

Abstract:

Lung cancer is a current public health issue for it is the leading cause of cancer related mortality in Western countries.

Non-small cell lung cancers (NSCLC) accounts for 80% of all lung malignant tumors, being adenocarcinoma the most prevalent histological subtype.

Despite the therapeutic breakthroughs, the results have still been unsatisfactory. Therefore, major efforts are being made in order to understand the pathophysiological mechanisms behind oncogenesis.

Recently, new molecular biomarkers involved in lung adenocarcinoma carcinogenesis have been described. EGFR, in particular, has been subject of numerous studies and several mutations and targeted therapies have already been described, as well as acquired therapeutic resistance after an effective initial response.

This paper aims to review the main molecular pathways involved in lung adenocarcinoma and their therapeutical potential.

Key words: lung adenocarcinoma; EGFR; KRAS; Tyrosine-kinase inhibitors; molecular targets; Terminal respiratory unit; ALK; HER2; BRAF.

Lista de abreviaturas e siglas:

BAC - bronquíolo-alveolar

CNPC - carcinomas de células não pequenas

CPC - carcinoma de pequenas células

EGFR - *epidermal growth factor receptor*

EML4-ALK - *echinoderm microtubule-associated protein-like 4 gene and the anaplastic lymphoma kinase*

ERK - cinase reguladora de sinal extracelular

HAA - hiperplasia adenomatosa atípica

HGF – Hepatocyte growth factor

HRM - fusão de alta resolução

Hsp90 - *heat shock protein*

MAPK - *mitogen-activated protein kinase*

MEK1 - *mitogen-activated protein kinase kinase 1*

PTEN - *phosphatase and tensin homolog*

Src - *proto-oncogene de tirosina cinase*

Scorpion ARMS - Scorpions Amplification Refractory Mutation System

STAT - signal transducer and activator of transcription

TK - tirosina cinase

TKI - inibidores da tirosina cinase

TTF-1 - thyroid transcription factor 1

URT - unidade respiratória terminal

Introdução:

Adenocarcinoma do pulmão:

O cancro do pulmão é um problema de saúde pública muito importante sendo das principais causas de morte por cancro decorrente da sua alta incidência, agressividade biológica e ausência de estratégias terapêuticas eficazes, estimando-se mais de um milhão de mortes por ano causadas por este cancro. [1-3]

O prognóstico dos doentes com cancro do pulmão é geralmente muito reservado, mesmo quando diagnosticado precocemente. Os doentes em estadio I têm uma taxa de sobrevida aos 5 anos de 70% após cirurgia, e mais de metade dos casos de CNPC sofrem recidiva após excisão.[4, 5] Mais de 50% dos doentes têm doença metastática aquando do diagnóstico, sendo a quimioterapia sistémica a opção terapêutica habitual. [6] Nesta circunstância, é fundamental esclarecer os mecanismos implicados no desenvolvimento e progressão do cancro do pulmão para definir estratégias mais adequadas no manuseamento e tratamento eficiente destes doentes.

O carcinoma do pulmão inclui vários tipos histológicos, habitualmente subdivididos em 2 grupos: CPC ($\approx 20\%$) e CNPC ($\approx 80\%$).[7] O CNPC inclui os seguintes subtipos: carcinoma de grandes células, carcinoma epidermoide e adenocarcinoma, cuja incidência tem aumentado muito nos últimos anos, ultrapassando a do carcinoma epidermoide e constituindo atualmente mais de 50% dos cancros do pulmão. [2, 8]

De acordo com a classificação da OMS de 2004, o adenocarcinoma do pulmão pode apresentar vários padrões histológicos: acinar, papilar, bronquíolo-alveolar, sólido com muco intracelular e misto (com mais de um padrão).(fig.1). De acordo com esta classificação,

mais de 90 % dos adenocarcinomas são mistos o que retira, na prática, significado prognóstico à classificação. Adicionalmente verificou-se apenas 41% de concordância interobservador na aplicação desta classificação dos adenocarcinomas, o que indica a necessidade de revisão para melhorar a sua reprodutibilidade e significado prognóstico.[7, 9]

Neste sentido foi proposta a reclassificação dos adenocarcinomas, que inclui ainda o padrão micropilar (fig. 2), bem como o perfil molecular. [10]

Marcadores moleculares:

EGFR

O EGFR é uma glicoproteína de membrana plasmática com 170 KDa, constituída por um domínio extracelular de ligação ao EGF (ligando), uma região transmembranar e um domínio TK intracelular. [11] A ligação do ligando ao EGFR induz a homo-dimerização do EGFR e a hétero-dimerização do EGFR com outros recetores da sua família: HER2/neu (ErbB2), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4). [12, 13] A dimerização do recetor causa alterações conformacionais que induzem a ativação de vias de sinalização intracelular, mediadas por proteínas efetoras, designadamente AKT, MAPK e STAT, que desempenham um papel fundamental em processos de regulação, estimulando a proliferação e a sobrevivência celular. [11, 14] A desregulação das vias de proliferação e de sobrevivência celular é crucial na oncogénese e na progressão tumoral. [14] Assim, a inativação *in vitro* e *in vivo* do EGFR tem efeito regulador negativo na ativação do AKT e da MAPK com a inibição consequente da proliferação, invasão, metastização e indução da apoptose das células tumorais. [6]

O EGFR pode ser reciclado, após ativação, para a superfície celular ou degradado na via proteolítica. [11]

O EGFR revelou-se um “alvo” terapêutico promissor submetido a vários estudos e ensaios clínicos.

Mutação ativadora:

As mutações ativadoras ocorrem numa fase precoce da carcinogénese. São importantes porque conferem uma alteração conformacional que mantêm a atividade TK independentemente da ação do ligando. A presença de uma única mutação na bolsa de ligação ao ATP no componente TK do EGFR leva à ativação parcial do EGFR, sendo que o recetor se torna completamente independente do ligando após uma mutação adicional.[15]

As mutações do *EGFR* ocorrem nos 4 domínios cinase (exões 18-21) e incluem deleções *in frame*, inserções/duplicações *in frame* e mutações pontuais. As mutações descritas nos 4 exões do EGFR são numerosas e envolvem muitos aminoácidos. [12]

Classificam-se geralmente em três classes principais, embora a maioria das mutações relacionadas com resposta aos TKI sejam da classe I e II. [15]

Na classe I incluem-se as deleções *in frame* do exão 19, que incluem geralmente os aminoácidos leucina-747 e o ácido glutâmico 749. [15]

As mutações classe II são substituições de um único nucleotídeo que causam alteração de um aminoácido. A mais importante é a mutação *L858R* no exão 21, com substituição de arginina por leucina. Outras mutações incluem a *G719S* no exão 18, com substituição glicina por serina, alanina ou cisteína, e outras mutações *missense*. [15]

Na classe III incluem-se as duplicações *in-frame* e/ou inserções no exão 20. [15]

As deleções *in frame* no exão 19 e a mutação pontual *L858R* no exão 21 constituem ≈90% das alterações moleculares do *EGFR*, denominando-se “clássicas” ou “*hot-spot*”. Estas mutações atingem domínios da bolsa de ligação do ATP, onde se ligam os TKIs do EGFR. As

mutações de *G719S* no exão 18 e a inserção no exão 20 são menos frequentes e causam proliferação tumoral menos acentuada e menor resposta aos TKIs. [16]

As mutações “*hot spot*” são muito características do cancro do pulmão (ocorrem raramente em carcinomas da tiroide, glândulas salivares e timo), sendo que a deleção no exão 19 confere maior capacidade de transformação maligna. [16] Foi descrito que a célula tumoral com a deleção no exão 19 tem autofosforilação constitutiva do EGFR apenas na presença de amplificação génica enquanto as células com mutação *L858R* têm autofosforilação constitutiva do EGFR independentemente da amplificação. [17]

Não foi descrita qualquer relação entre mutação e/ou amplificação do EGFR e outras alterações genéticas comuns no cancro do pulmão (Ex: mutação do *KRAS*), e as mutações de EGFR e *KRAS* parecem ser mutuamente exclusivas. [14, 18]

Foram descritas outras mutações do *EGFR*, mas a maioria sem significado terapêutico com TKIs. Estas mutações podem constituir artefactos decorrentes das técnicas utilizadas para a sua deteção e outras podem representar polimorfismos germinativos. [19]

Incidência dominante da mutação do *EGFR* nos Asiáticos de Leste

Vários estudos demonstraram maior incidência da mutação em indivíduos do Leste Asiático; a identificação de mutações em emigrantes asiáticos de 2ª geração suportam o conceito de que diferenças étnicas refletem-se diretamente em diferenças genéticas e não geográficas. [16] De facto, foi descrita variação na frequência da mutação de *EGFR* em carcinomas do pulmão em indivíduos de etnias diferentes: Taiwan (48%), Japão (33%), EUA (3-9%). [20] Alguns estudos mostraram que a mutação *EGFR* era mais comum em

caucasianos do que em afro-americanos. Estes resultados não foram confirmados num estudo mais recente que descreveu taxas de mutação idênticas nestes dois grupos. [21]

Maior incidência de mutação de EGFR em mulheres e em não fumadores

A expressão de recetores de estrogénio associa-se à mutação de *EGFR*; estudos *in vitro* indicam que a estimulação estrogénica pode libertar ligandos e ativar a via do *EGFR*. [16]

O aumento do nível de MiR-21, que é um inibidor da apoptose regulado pela via do *EGFR*, foi descrito em não fumadores. [16] O MiR-21 é uma molécula de ARN não codificante potencialmente envolvida na oncogénese do adenocarcinoma do pulmão. [22] Salienta-se que algumas das mutações do *EGFR* foram descritas como mais frequentes no género feminino e em não fumadores. [16] A deleção do exão 19 é significativamente menos frequente em homens fumadores do que em mulheres fumadoras. [16] Adicionalmente descreveram-se mais mutações em fumadores passivos do que em fumadores ativos, sugerindo que o tabaco não está implicado nos mecanismos de mutação do *EGFR*. [23]

Amplificação do gene do EGFR:

Vários estudos sugerem que o número de cópias do gene é um indicador preditivo da resposta aos TKIs mais específico do que a mutação do *EGFR*. Nestes estudos, a polissomia, definida como a presença de mais de 40% de células tetraplóides, tal como a amplificação, foi considerada uma alteração genética importante. [16]

A amplificação do *EGFR* relaciona-se com a presença de mutação no adenocarcinoma mas não no carcinoma epidermoide [16] Admite-se que a baixa incidência de mutações do

EGFR no carcinoma epidermoide e as diferenças na patogénese da amplificação em ambos os tipos histológicos podem explicar esta associação. Nos adenocarcinomas descreveu-se que o alelo mutante é amplificado especificamente, por um mecanismo de “desequilíbrio mutante alelo-específico” - MASI, em que a mutação precede a amplificação. [14, 16]

Yatabe *et al* descreveram que a amplificação do *EGFR* ocorria durante a fase de invasão do adenocarcinoma do pulmão com mutações no *EGFR*; Soh *et al* descreveram o aumento no número de cópias do gene do *EGFR* no adenocarcinoma pulmonar como um evento tardio, reforçando o conceito de que a amplificação é precedida pela mutação.[24]

Admite-se que o desenvolvimento do adenocarcinoma do pulmão ocorre de forma sequencial: mutação inicial no epitélio normal e número elevado de cópias de *EGFR* na fase invasora do tumor.[1] Neste pressuposto, a mutação do *EGFR* parece ser um evento precoce na patogénese do adenocarcinoma do pulmão, precedendo o aumento do número de cópias, e sendo detetada no epitélio bronquiolar e alveolar em 43% de casos de adenocarcinomas pulmonares com mutação do *EGFR*. (24) A mutação parece ser um evento inicial, observado na HAA que é precursora do adenocarcinoma; a HAA pode evoluir para adenocarcinoma *in situ* (carcinoma bronquíolo-alveolar), e eventualmente adenocarcinoma invasor. A amplificação do gene ocorre em fases mais tardias da progressão para adenocarcinoma invasor.[16]

Não há evidência de associação entre a sobre-expressão do *EGFR* com a presença de mutação do gene, nem com o número elevado de cópias genicas. [25]

Relação da mutação do EGFR com os subtipos do adenocarcinoma do pulmão

A mutação do *EGFR* associa-se frequentemente aos diferentes padrões histológicos de adenocarcinoma pulmonar. Estas mutações foram descritas como mais prevalentes no adenocarcinoma com componente BAC, isto é, adenocarcinoma misto, com padrão papilar e/ou acinar e com componente BAC na periferia. Descrevem-se mutações de *EGFR* em 32% de adenocarcinomas com componente BAC; no entanto, 29% dos casos com mutação do *EGFR* não tinham componente BAC, sugerindo que este padrão não ocorre em todos os adenocarcinomas com mutação do *EGFR*. [16]

Num estudo de 15 adenocarcinomas, descreveu-se que as mutações do *EGFR* são 2 vezes mais frequentes do que previamente descrito nos adenocarcinomas papilares e micropapilares; no entanto também descreveram outras mutações, nomeadamente no *KRAS* e no *BRAF*, nestes padrões histológicos.[26]

Unidade respiratória terminal

O pulmão é constituído pela árvore brônquica e pelo parênquima pulmonar, sendo que no desenvolvimento pulmonar há 2 fases (morfogénese brônquica, seguida pela diferenciação do parênquima pulmonar), em que o TTF-1 desempenha um papel crucial.[16]

A URT é constituída por uma grande quantidade de células que incluem células cilíndricas não ciliadas e pneumócitos. O TTF-1 é expresso num tipo histológico de adenocarcinoma que se caracteriza por células neoplásicas semelhantes às da unidade respiratória terminal. A proteína do surfactante é identificada em adenocarcinomas que expressam o TTF-1.[16] Os adenocarcinomas com expressão de TTF-1 ocorrem mais

frequentemente em mulheres não fumadoras; é interessante notar que as mutações do *EGFR* são mais frequentes neste grupo de adenocarcinomas.[16]

Há evidências que suportam o conceito de que a progressão de adenocarcinomas do pulmão, na sequência de HAA e adenocarcinoma *in situ* (BAC), ocorre em adenocarcinomas do tipo URT que expressam TTF-1. Por outro lado, os adenocarcinomas sem fenótipo de tipo unidade respiratória terminal, são geralmente menos diferenciados e não parecem seguir esta sequência de carcinogénese.[16]

É importante salientar que as células do epitélio bronquíolar e alveolar que expressam TTF-1, não são exclusivas do adenocarcinoma com mutação do *EGFR*, porque pode haver mutação em células com fenótipo distinto das células da unidade respiratória terminal.[25]

Os adenocarcinomas associados a mutação do *BRAF* expressam TTF-1, tal como os com a mutação *HER2* e translocação *EML4-ALK*; como estes tumores expressam TTF-1 e surfactante, são incluídos neste grupo de adenocarcinoma de tipo unidade respiratória terminal.[16]

Diagnóstico:

Na prática clínica há restrições para a colheita de material apenas para estudos genéticos. De facto, a maioria dos doentes com CNPC são diagnosticados em estadios avançados, não cirúrgicos, e o diagnóstico é realizado em material de biopsia (por vezes apenas citologia), o que limita a realização de estudos adicionais. Por outro lado a proporção

de células neoplásicas /não neoplásicas é outro fator por vezes limitante destes estudos em material de biópsia.[27]

É muito importante selecionar adequadamente os doentes com adenocarcinoma do pulmão com indicação para tratamento com EGFR TKIs. [24] Assim, é fundamental estabelecer quais os melhores métodos para o diagnóstico deste grupo de doentes, considerando o custo-eficácia cada vez mais importante na medicina moderna. O número de cópias do gene *EGFR* determinados por FISH, a expressão proteica avaliada por imunohistoquímica e as mutações do domínio TK foram vários dos métodos usados previamente para decisão terapêutica.

A sequenciação do DNA é um dos métodos mais utilizados, recorrendo a métodos como o *Scorpion ARMS*, DHPLC, HRM e a sequenciação ultra-profunda. [24, 26, 28-30]

A quantificação de cópias de EGFR por FISH ou CISH é também usada em adenocarcinomas do pulmão. O método FISH é usado na avaliação da amplificação do MET nos adenocarcinomas pulmonares inicialmente sensíveis aos TKIs, particularmente nos que desenvolvem resistência.[28] A CISH foi também avaliada como método alternativo.[31]

A utilização de anticorpos monoclonais específicos da mutação do EGFR tem revelado resultados promissores.[32]

A análise de mutações EGFR é um teste preditivo e prognóstico e está indicado na prática clínica. Há métodos alternativos em avaliação para eventual validação.[28]

Tratamento:

Até há cerca de 8 anos, a quimioterapia era a única terapêutica sistémica disponível, com uma sobrevida mediana de 8 - 14 meses. Com a introdução dos TKIs, observou-se um

avanço na resposta terapêutica e melhoria na sobrevida de doentes com CNPC com mutação do *EGFR*. [33] As variações observadas na eficácia da terapêutica TKI resultam das diferentes mutações no *EGFR* em cada caso. [34]

Os TKIs e os anticorpos monoclonais contra o EGFR são as principais terapêuticas no tratamento dos adenocarcinomas pulmonares com mutação do *EGFR*. [34]

Os anticorpos monoclonais, como o cetuximab, interferem com a ligação ao domínio extracelular do EGFR, bloqueando a via de sinalização. Mukohara *et al* e Tsuchihashi *et al* descreveram que o cetuximab não é tão eficaz como o gefitinib e erlotinib em tumores com mutações no domínio TK do EGFR. [49] Estudos descrevem que o tratamento a curto prazo com cetuximab não foi eficaz, mas a longo prazo foi. [34, 35]

Foram desenvolvidos outros anticorpos monoclonais como o matuzumab, que impede a alteração conformacional do EGFR necessária para a dimerização e o anticorpo nimotuzumab, que bloqueia diretamente o acesso do ligando ao local de ligação III do EGFR. [11] Todos os anticorpos parecem causar toxicidade nas células do CNPC. A resposta com estes anticorpos parece não estar relacionada com a mutação do *EGFR* ao contrário dos TKIs. [31]

O gefitinib e erlotinib são inibidores reversíveis da TK do EGFR utilizados no tratamento do CNPC. Inibem a atividade da TK ao ligarem-se ao receptor do ATP no domínio catalítico. [34] A mutação *EGFR* sensível aos inibidores da TK é o fator mais importante na eficácia terapêutica do gefitinib, independente do género e de o doente ser ou não fumador. [36]

Um ensaio clínico em asiáticos não fumadores ou fumadores leves com adenocarcinoma do pulmão estadio IV e mutação *EGFR* descreveu taxa de resposta maior no grupo tratado com gefitinib versus carboplatina e paclitaxel, como terapêutica de 1ª linha, (71 vs 1%). Observou-se melhoria no tempo de sobrevida livre de doença em doentes com ressecção completa estadio I - III com mutação *EGFR* tratados com gefitinib ou erlotinib peri-operatória quando comparado com doentes não submetidos a esta terapêutica.[5]

Há diferenças na resposta ao gefitinib e erlotinib, dependendo do tipo de mutações do EGFR. Tumores com deleções no exão 19 conferem uma sobrevida média maior do que nos casos de mutação pontual L858R no exão 21. Mitsudomi *et al* descreveram maior taxa de resposta ao gefitinib em doentes com deleção do exão 19 do *EGFR* quando comparada com casos com outro tipo de mutações, predominantemente a L858R. Outros estudos corroboraram estes resultados: taxa de resposta maior nas deleções do exão 19, seguidas do L858R e G719X. Greulich *et al* descreveram uma mutação de inserção (D770insNPG) no exão 20 associada com a resistência *in vitro* ao erlotinib.[12]

Aproximadamente 75 % dos doentes com a mutação EGFR respondem ao tratamento com TKIs enquanto 10 % dos doentes sem mutação respondem. No entanto, depois de uma resposta inicial prolongada, virtualmente todos os casos adquirem resistência.[37]

Ácido docosahexanóico (DHA)

O ácido docosahexanóico pode alterar as propriedades, a estrutura e organização dos microdomínios membranares, especialmente os *rafts* lipídicos, onde se localiza o EGFR. Estudos recentes sugerem que o DHA pode diminuir a sua localização nos *rafts*, diminuindo a

atividade de vias sinalizadoras e a proliferação celular, constituindo uma opção terapêutica potencial complementar dos TKIs.[38]

Pemetrexed

O pemetrexed é um inibidor da sintase do timidilato e parece ter alguma eficácia na terapêutica do adenocarcinoma do pulmão com a mutação *EGFR*, aumentando o tempo de sobrevida sem progressão da doença.[39]

O nível de expressão da sintase do timidilato é um fator que influencia a sensibilidade ao pemetrexed, sendo que níveis elevados podem causar resistência à sua ação. Como as células com a mutação *EGFR* estão geralmente associadas a nível baixo de sintase do timidilato, são sensíveis, tornando este agente uma opção terapêutica a explorar.[39]

Resistência ao tratamento:

Os inibidores da tirosina cinase de 1ª geração revelaram-se eficazes nos carcinomas do pulmão com mutações no *EGFR*. No entanto, apesar da resposta inicial, a maioria dos doentes desenvolve resistência a estes agentes através de vários mecanismos.[40] As mutações secundárias são os mais comuns: a mutação *T790M* em cerca de metade dos casos, a *D716Y* e a *T854A* raramente. Outro mecanismo é a ativação da via *MET* por amplificação do *MET* (~de 20%) ou por activação do *MET* pelo ligando *HGF*. A alteração do *PTEN*, em ~3% dos casos e a presença de mini clones de células com mutação *KRAS* também foram descritas. [16]

T790M

Cerca de metade dos casos com resistência aos TKIs resultam de mutação *T790M* no exão 20 do domínio cinase do EGFR. A mutação é secundária, embora tenha sido descrita como primária numa família europeia. Esta apenas confere resistência quando é inserida em *cis*. [16]

A mutação *T790M* do EGFR localiza-se na bolsa de ligação do ATP levando a uma alteração da topologia. Esta mutação fornece vantagem de crescimento celular, quer *in vitro* quer *in vivo*, sugerindo que é oncogénica decorrente do aumento da atividade da cinase. [11] O tratamento com TKIs de 2ª geração em monoterapia poderia induzir resistência tal como os TKIs de 1ª geração. A combinação destes fármacos com cetuximab ou rapamicina pode ser uma estratégia para minimizar a ocorrência da mutação *T790M*, responsável por estas resistências secundárias. [11]

O vandetanib, um inibidor duplo do EGFR e VEGFR e o anticorpo anti-VEGF bevacizumab, foram descritos como eficazes em monoterapia, enquanto que a geldanamicina, um inibidor da Hsp90, pode ser uma estratégia eficaz para os casos de resistência secundária. [11]

MET

O MET é um receptor TK do factor de crescimento hepatocitário. A sobreexpressão do MET foi descrita em vários cancros e associa-se à proliferação celular, inibição da apoptose e metastização. [33]

A ativação e sobreexpressão do MET foi observada de forma substancial em adenocarcinomas do pulmão, associada a padrão papilar, característica morfológica que se

associada à mutação EGFR, sugerindo a possibilidade de co-operação dos dois recetores tirosina cinase.[41]

A amplificação MET associa-se à aquisição de resistência aos TKIs, tendo sido observada em 20% destes casos. Ensaio clínicos indicam que os inibidores do MET podem ser utilizados neste contexto. A pesquisa de alteração do MET, por FISH, pode revelar-se um marcador de resistência aos TKIs ou seja, um fator preditivo de resposta aos inibidores do MET.[33]

Na terapêutica destes doentes a combinação do gefitinib com um inibidor do MET, o PHA665752, pode regular negativamente a sobrevivência destas células resistentes. O dasatinib, que inibe o Src pode ser uma alternativa, porque o Src atua em ambas as vias.[11]

Nos adenocarcinoma bronquíolo-alveolar (BAC) não foram descritas alterações da expressão de MET.[33]

PTEN

O PTEN é uma fosfatase inibidora da via do PIP3K/AKT, (desfosforila o PIP3, inibindo a ativação do AKT). A regulação negativa ou a ausência da expressão de PTEN promove a sinalização intracelular do EGFR.[15, 16]

É interessante constatar que o PTEN foi descrito apenas em tumores com expressão intensa de HGF. A perda de função do PTEN poderá representar um mecanismo adicional de resistência adquirida em tumores com sobreexpressão de HGF. De facto, há evidência de interação direta entre o PTEN e o HGF em células de glioblastoma; o PTEN tem um efeito inibidor da PI3-cinase que é efetor nas cascatas de sinalização ativadas pelo MET (receptor do HGF).[42]

A perda de função do PTEN não se associa necessariamente com sobreexpressão do AKT. Yamasaki *et al.* descreveram que a regulação negativa do PTEN pode representar uma fase precoce na resistência, regulação positiva subsequente do AKT e outros mecanismos adicionais que podem promover a resistência aos tratamentos com TKIs.[42]

Inibidores da tirosina cinase de 2ª geração

Os inibidores irreversíveis atuam bloqueando o EGFR e atuando noutros membros da família ErbB, como o HER2 e outras vias; foram descritos como tendo efeito nos casos com resistência adquirida ao erlotinib e gefitinib.[40, 43]

Vários TKIs de 2ª geração estão a ser avaliados, como o EKB-569, HKI-272, CI-1033, ZD6474, PF299804 e BIBW2992.[40, 43, 44]

A eficácia do HKI-272, que tem atividade nos adenocarcinomas pulmonares *EGFR* mutantes resistentes ao gefitinib e erlotinib, dá suporte à probabilidade do seu uso em combinação com o erlotinib como primeira linha para minimizar a ocorrência de resistência.[35]

O BIBW2992 atua como um inibidor irreversível duplo do EGFR/HER2. Foi descrito como eficaz em doentes com resistência primária ao erlotinib, com inserção no exão 20, ou com resistência adquirida (*T790M*).[40]

Não é previsível uma resposta eficaz BIBW2992 em doentes com resistência primária aos inibidores de 1ª geração da tirosina cinase do EGFR por estes tumores apresentarem mutação no KRAS (*Pao et al, 2005*) ou resistência adquirida por amplificação do MET. A combinação de BIBW2992 com rapamicina pode ser eficaz nestes casos em que a resistência

é adquirida pela amplificação do MET.[40] O BIBW2992 foi descrito com eficácia em tumores EGFR sensíveis ao erlotinib, sendo que em combinação com a rapamicina , associou-se a resposta tumoral quase completa e mais eficaz do que a induzida pelo erlotinib num carcinoma pulmonar EGFR sensível ao erlotinib.[40]

Este estudo sugere que o BIBW2992 é superior ao HKI-272 na indução da regressão de tumores com mutação *T790M*, quando em monoterapia ou em combinação com a rapamicina.[40]

Outras possíveis vias de atuação:

mTOR

A via de sinalização mTOR regula a proliferação e sobrevivência celular e mecanismos de angiogénese, tendo sido implicada na resistência ao tratamento com TKIs . O inibidor mTOR, everolimus, reduz a expressão de EGFR co-operando com o gefitinib para superar resistências.[37]

miR-21

Dada a importância do miR-21 na oncogénese, poderá ser um alvo para terapia em adenocarcinomas com ou sem mutação do EGFR: o miR-21 foi descrito como expresso em células sem a mutação do EGFR. O anti-miR-21 tem pouco efeito quando usado em monoterapia, indicando que a sua combinação com os TKIS é possivelmente útil para atenuação efetiva da via do EGFR de sobrevivência celular .[22]

STAT 3

O STAT 3 foi descrito como um mediador dos efeitos oncogénicos das mutações do EGFR, sendo ativado pela expressão de IL-6 que ativa a via gp 130/JAK. A inibição do STAT3 pode ser efetiva em tumores EGFR mutantes por mecanismos diferentes vias.[8]

KRAS

O KRAS mostrou ser importante em 20-40% dos adenocarcinomas pulmonares (51). Cerca de 95% das mutações do *KRAS* estão localizadas no codão 12 e 13 do exão 2 e, raramente, no codão 59 e 61 do exão 3.[31, 45]

A família de genes *RAS* inclui 3 membros (*HRAS*, *KRAS* e *NRAS*) que codificam proteínas reguladoras da proliferação celular, diferenciação e apoptose.[45, 46]

As mutações no *KRAS* ocorrem precocemente e associam-se a outras alterações moleculares como a mutação do *p53*, metilação do *p16*, inativação do *RASSF1* e sobreexpressão de diversos fatores de crescimento, como o VEGF.[47]

Dos vários fatores ambientais envolvidos salienta-se o tabaco, considerado o principal fator de risco (há uma relação direta entre o número de cigarros fumados e a prevalência de mutações do *KRAS*), e a exposição aos asbestos.[47]

Vários estudos descreveram associação inversa entre mutações *KRAS* e *EGFR* no domínio TK. Estas constatações suportam o conceito de duas vias distintas na carcinogénese pulmonar: a do *KRAS* e a do *EGFR*. Quando associada à mutação do *EGFR*, a mutação do *KRAS* é a principal responsável pela resistência aos TKIs.[47]

A mutação do *KRAS* parece ser um fator de mau prognóstico, associado a sobrevida curta independente dos tratamentos realizados.[47]

Comparando dois grupos, um com mutação do *EGFR* e outro com mutação *KRAS*, o 1º apresenta maior taxa de sobrevida. Há varias explicações possíveis: grande parte do aumento da sobrevida associa-se à resposta aos TKIs; tumores com a mutação *EGFR* respondem melhor ao tratamento com drogas citotóxicas do que tumores com mutação *KRAS* sugerindo que a mutação do *EGFR* confere melhor prognóstico.[13] Doentes com mutação *EGFR* têm sobrevida livre de progressão da doença maior (18.8 meses) do que com mutação do *KRAS* (13.3 meses).[48]

ALK

O gene de fusão *EML4-ALK* foi identificado em 2007 por FISH como um oncogene envolvido numa percentagem baixa de adenocarcinomas do pulmão. Os tumores *EML4-ALK* são considerados um novo subgrupo molecular distinto de carcinomas do pulmão, quase exclusivamente adenocarcinomas, sem mutação do *EGFR* ou do *KRAS* e que ocorrem em não fumadores.[49, 50]

O *EML4-ALK* associa-se a resistência aos TKIs pelo que a terapêutica deve ser dirigida ao produto da translocação específica.

O mecanismo proposto para a oncogénese é o da preservação do domínio *EML4* cuja ativação constitutiva no pulmão se admite ser responsável pela ativação do *ALK* e da sua via de sinalização (*AKT*, *STAT3*, *ERK1/2*), com aumento da proliferação celular e invasão.[49]

O crizotinib foi identificado como inibidor das TK do *ALK*, tendo-se descrito como bem tolerado, com controlo da doença em $\approx 90\%$ dos tumores com rearranjo do *ALK*. [47, 50]

O crizotinib foi descrito como controlando tumores EML4-ALK em doentes refratários aos TKIs, embora também tenham já sido descritas resistências com este fármaco.[47]

O crizotinib não atravessa a barreira hemato-encefálica e, assim não atinge níveis suficientes para controlar a metastização cerebral. [47]

Apesar do gene de fusão *EML4-ALK* ser de longe o mais comum em adenocarcinomas pulmonares, foram descritos outros genes de fusão envolvendo o ALK, quer com o *TFG*, quer com o *KIF5B*. [49]

HER2

O HER2 (também designado por NEU, EGFR2 ou ERBB2), um dos membros da família do EGFR, desempenha um papel importante na patogénese de diferentes tipos de cancro.[51]

No carcinoma do pulmão verificou-se que as mutações *HER2* eram raras (cerca de 2%), aparentemente exclusivas de adenocarcinoma, a maioria duplicações/inserções *in frame* nos codões 776-779 (YMVA).[51]

As mutações no *HER2* são mais comuns em doentes da Ásia de Leste, em mulheres e em não fumadores, e mais frequentes em adenocarcinomas com componente BAC, tal como acontece com a mutação do EGFR, o que sugere a possibilidade de suscetibilidade genética ou de carcinogénios ambientais.[51]

Adenocarcinomas com mutações do *HER2* são candidatos potenciais para tratamento com inibidores específicos.

BRAF

As mutações *BRAF* foram descritas em CNPC. A mutação V600E do *BRAF* ocorre em $\approx 90\%$ dos casos e associa-se a instabilidade microsatélite. [31] Os inibidores do BRAF podem constituir terapêutica alternativa nos doentes com esta mutação.[19]

PIK3CA

O *PIK3CA* codifica a sub-unidade p110 α da cinase-3 do fosfatidilinositol (PIK3), uma molécula de sinalização presente nas vias de sinalização dos recetores de fatores de crescimento como o HER/ERBB2. O PIK3 ativado fosforila a AKT que por sua vez leva à ativação da via do mTOR .[52]

A taxa de mutações de *PIK3CA* no CNPC é $\approx 1 - 4 \%$. As mutações ocorrem mais frequentemente no domínio de ligação codificado pelo exão 9 (E542K e E545K) e na subunidade catalítica do p110 α codificado pelo exão 20. As mutações no domínio de ligação interferem com a ligação da p85 e permitem a ativação da PI3K enquanto se admite que as mutações na subunidade catalítica aumentam a atividade da TK. [52]

Ao contrário da maioria das mutações dos oncogenes implicados no adenocarcinoma do pulmão, que são mutuamente exclusivas (EGFR, KRAS), a mutação do *PIK3CA* ocorre geralmente associada a outras mutações.[52]

FGFR4

O FGFR4 é um receptor monomérico proteico TK com 3 domínios imunoglobulina-*like* na região extracelular, constituindo um dos 4 recetores de grande afinidade para múltiplos

membros da família de ligandos FGF envolvidos na angiogénese, proliferação e diferenciação celular. [53]

Mutações do FGFR4 foram descritas em casos raros de adenocarcinoma do pulmão, e identificadas no exão 16 (mutação Glu681Lys), que se admite causarem alterações funcionais do domínio catalítico da TK. [53]

MEK1

O MEK1 é um efetor da via MAPK e a sua expressão induz a ativação constitutiva da ERK, causando proliferação celular independente do fator de crescimento. [54]O MEK1 foi muito raramente descrito no carcinoma do pulmão e pode constituir um alvo terapêutico efetivo nestes doentes com adenocarcinoma do pulmão. [54]

ROS1

O ROS1 é um homólogo humano do gene transformador do vírus sarcoma aviário UR2 que codifica um receptor de tirosina cinase da família do receptor de insulina. As mutações de fusão ativadoras do ROS1 foram descritas no glioblastoma, e mais recentemente também no carcinoma do pulmão.[45] Verificou-se que células do adenocarcinoma do pulmão *knockout* para a fusão do ROS1 sofriam apoptose, indicando que a fusão do ROS1 é importante para a sobrevivência celular. As células com fusão do ROS1 são sensíveis ao inibidor da tirosina cinase crizotinib.[55]

Conclusão:

O carcinoma do pulmão é um dos mais frequentes e letais em todo o Mundo e, apesar das terapêuticas instituídas, a sobrevida aos 5 anos não tem sofrido alterações significativas.

O adenocarcinoma é o tipo histológico mais frequente de carcinoma do pulmão.

Inúmeras publicações salientam o papel das terapêuticas alvo no aumento da sobrevida destes doentes e esforços têm sido feitos para identificar biomarcadores que permitam selecionar os casos que beneficiarão destas terapêuticas. Foram descritas alterações moleculares preditivas de resposta às novas terapêuticas alvo.

A mutação do *EGFR*, que se associa a alguns padrões histológicos de adenocarcinomas, é um marcador preditivo e validado de resposta aos TKIs EGFR como terapia de 1ª linha nos doentes em estádios avançados.

Tal como o EGFR, o ALK é um importante alvo terapêutico no cancro do pulmão.

Outros marcadores moleculares e terapêuticas dirigidas estão em estudo.

Bibliografia:

1. Liu Y, Xu ML, Zhong HH, Heng WJ, Wu BQ: **EGFR mutations are more frequent in well-differentiated than in poor-differentiated lung adenocarcinomas.** *Pathol Oncol Res* 2008, **14**(4):373-379.
2. Shibata T, Hanada S, Kokubu A, Matsuno Y, Asamura H, Ohta T, Sakamoto M, Hirohashi S: **Gene expression profiling of epidermal growth factor receptor/KRAS pathway activation in lung adenocarcinoma.** *Cancer Sci* 2007, **98**(7):985-991.
3. Raso MG, Behrens C, Herynk MH, Liu S, Prudkin L, Ozburn NC, Woods DM, Tang X, Mehran RJ, Moran C *et al*: **Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors identifies a subset of NSCLCs and correlates with EGFR mutation.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(17):5359-5368.
4. Wang T, Niki T, Goto A, Ota S, Morikawa T, Nakamura Y, Ohara E, Ishikawa S, Aburatani H, Nakajima J *et al*: **Hypoxia increases the motility of lung adenocarcinoma cell line A549 via activation of the epidermal growth factor receptor pathway.** *Cancer Sci* 2007, **98**(4):506-511.
5. D'Angelo SP, Park B, Azzoli CG, Kris MG, Rusch V, Ladanyi M, Zakowski MF: **Reflex testing of resected stage I through III lung adenocarcinomas for EGFR and KRAS mutation: report on initial experience and clinical utility at a single center.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011, **141**(2):476-480.
6. Wu W, O'Reilly MS, Langley RR, Tsan RZ, Baker CH, Bekele N, Tang XM, Onn A, Fidler IJ, Herbst RS: **Expression of epidermal growth factor (EGF)/transforming growth factor-alpha by human lung cancer cells determines their response to EGF receptor tyrosine kinase inhibition in the lungs of mice.** *Mol Cancer Ther* 2007, **6**(10):2652-2663.
7. Neumann J, Feuerhake F, Kayser G, Wiech T, Aumann K, Passlick B, Fisch P, Werner M, Zur Hausen A: **Gene expression profiles of lung adenocarcinoma linked to histopathological grading and survival but not to EGF-R status: a microarray study.** *BMC Cancer* 2010, **10**:77.
8. Takata S, Takigawa N, Segawa Y, Kubo T, Ohashi K, Kozuki T, Teramoto N, Yamashita M, Toyooka S, Tanimoto M *et al*: **STAT3 expression in activating EGFR-driven adenocarcinoma of the lung.** *Lung Cancer* 2012, **75**(1):24-29.
9. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, Powell CA, Beer D, Riely G, Garg K *et al*: **International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary.** *Proc Am Thorac Soc* 2011, **8**(5):381-385.
10. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE *et al*: **International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma.** *J Thorac Oncol* 2011, **6**(2):244-285.
11. Yoshida T, Zhang G, Haura EB: **Targeting epidermal growth factor receptor: central signaling kinase in lung cancer.** *Biochem Pharmacol* 2010, **80**(5):613-623.
12. Vlastos F, Zinszner J, Hussenet T, du Manoir S, Vordonis L, Nikolakopoulou S, Hardavella G, Lacomme S, Vignaud JM, Martinet N: **Mapping EGFR1 mutations in patients with lung adenocarcinoma.** *Diagn Mol Pathol* 2010, **19**(4):209-217.
13. Sonobe M, Kobayashi M, Ishikawa M, Kikuchi R, Nakayama E, Takahashi T, Menju T, Takenaka K, Miyahara R, Huang CL *et al*: **Impact of KRAS and EGFR Gene Mutations on Recurrence and Survival in Patients with Surgically Resected Lung Adenocarcinomas.** *Ann Surg Oncol* 2011, 1-8.
14. Arifin M, Hiyama K, Tanimoto K, Wiyono WH, Hiyama E, Nishiyama M: **EGFR activating aberration occurs independently of other genetic aberrations or telomerase activation in adenocarcinoma of the lung.** *Oncol Rep* 2007, **17**(6):1405-1411.

15. Bronte G, Rizzo S, La Paglia L, Adamo V, Siragusa S, Ficorella C, Santini D, Bazan V, Colucci G, Gebbia N *et al*: **Driver mutations and differential sensitivity to targeted therapies: a new approach to the treatment of lung adenocarcinoma.** *Cancer Treat Rev* 2010, **36 Suppl 3**:S21-29.
16. Yatabe Y: **EGFR mutations and the terminal respiratory unit.** *Cancer Metastasis Rev* 2010, **29**(1):23-36.
17. Sholl LM, Yeap BY, Iafrate AJ, Holmes-Tisch AJ, Chou YP, Wu MT, Goan YG, Su L, Benedettini E, Yu J *et al*: **Lung adenocarcinoma with EGFR amplification has distinct clinicopathologic and molecular features in never-smokers.** *Cancer Res* 2009, **69**(21):8341-8348.
18. Hata A, Katakami N, Fujita S, Kaji R, Imai Y, Takahashi Y, Nishimura T, Tomii K, Ishihara K: **Frequency of EGFR and KRAS mutations in Japanese patients with lung adenocarcinoma with features of the mucinous subtype of bronchioloalveolar carcinoma.** *J Thorac Oncol* 2010, **5**(8):1197-1200.
19. Ladanyi M, Pao W: **Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond.** *Mod Pathol* 2008, **21 Suppl 2**:S16-22.
20. Hsieh RK, Lim KH, Kuo HT, Tzen CY, Huang MJ: **Female sex and bronchioloalveolar pathologic subtype predict EGFR mutations in non-small cell lung cancer.** *Chest* 2005, **128**(1):317-321.
21. Reinersman JM, Johnson ML, Riely GJ, Chitale DA, Nicastri AD, Soff GA, Schwartz AG, Sima CS, Ayalew G, Lau C *et al*: **Frequency of EGFR and KRAS mutations in lung adenocarcinomas in African Americans.** *J Thorac Oncol* 2011, **6**(1):28-31.
22. Seike M, Goto A, Okano T, Bowman ED, Schetter AJ, Horikawa I, Mathe EA, Jen J, Yang P, Sugimura H *et al*: **MIR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(29):12085-12090.
23. Sonobe M, Manabe T, Wada H, Tanaka F: **Mutations in the epidermal growth factor receptor gene are linked to smoking-independent, lung adenocarcinoma.** *Br J Cancer* 2005, **93**(3):355-363.
24. Liang Z, Zhang J, Zeng X, Gao J, Wu S, Liu T: **Relationship between EGFR expression, copy number and mutation in lung adenocarcinomas.** *BMC Cancer* 2010, **10**:376.
25. Tang X, Varella-Garcia M, Xavier AC, Massarelli E, Ozburn N, Moran C, Wistuba, II: **Epidermal growth factor receptor abnormalities in the pathogenesis and progression of lung adenocarcinomas.** *Cancer Prev Res (Phila)* 2008, **1**(3):192-200.
26. De Oliveira Duarte Achcar R, Nikiforova MN, Yousem SA: **Micropapillary lung adenocarcinoma: EGFR, K-ras, and BRAF mutational profile.** *Am J Clin Pathol* 2009, **131**(5):694-700.
27. Dacic S: **Molecular diagnostics of lung carcinomas.** *Arch Pathol Lab Med* 2011, **135**(5):622-629.
28. Dacic S: **EGFR assays in lung cancer.** *Adv Anat Pathol* 2008, **15**(4):241-247.
29. Borrás E, Jurado I, Hernán I, Gamundi MJ, Dias M, Martí I, Mane B, Arcusa A, Agundez JA, Blanca M *et al*: **Clinical pharmacogenomic testing of KRAS, BRAF and EGFR mutations by high resolution melting analysis and ultra-deep pyrosequencing.** *BMC Cancer* 2011, **11**:406.
30. Qin L, Zhong W, Zhang L, Li LY, Wang MZ: **Comparison of three methods for detecting epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples of Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer.** *Chin Med J (Engl)* 2011, **124**(6):887-891.
31. Chiosea S, Shuai Y, Cieply K, Nikiforova MN, Dacic S: **EGFR fluorescence in situ hybridization-positive lung adenocarcinoma: incidence of coexisting KRAS and BRAF mutations.** *Hum Pathol* 2010, **41**(8):1053-1060.
32. Kozu Y, Tsuta K, Kohno T, Sekine I, Yoshida A, Watanabe S, Tamura T, Yokota J, Suzuki K, Asamura H *et al*: **The usefulness of mutation-specific antibodies in detecting epidermal growth factor receptor mutations and in predicting response to tyrosine kinase inhibitor therapy in lung adenocarcinoma.** *Lung Cancer* 2011, **73**(1):45-50.

33. Tanaka A, Sueoka-Aragane N, Nakamura T, Takeda Y, Mitsuoka M, Yamasaki F, Hayashi S, Sueoka E, Kimura S: **Co-existence of positive MET FISH status with EGFR mutations signifies poor prognosis in lung adenocarcinoma patients.** *Lung Cancer* 2012, **75**(1):89-94.
34. Ji H, Li D, Chen L, Shimamura T, Kobayashi S, McNamara K, Mahmood U, Mitchell A, Sun Y, Al-Hashem R *et al*: **The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies.** *Cancer Cell* 2006, **9**(6):485-495.
35. Arteaga CL: **EGF receptor mutations in lung cancer: from humans to mice and maybe back to humans.** *Cancer Cell* 2006, **9**(6):421-423.
36. Toyooka S, Takano T, Kosaka T, Hotta K, Matsuo K, Ichihara S, Fujiwara Y, Soh J, Otani H, Kiura K *et al*: **Epidermal growth factor receptor mutation, but not sex and smoking, is independently associated with favorable prognosis of gefitinib-treated patients with lung adenocarcinoma.** *Cancer Sci* 2008, **99**(2):303-308.
37. Taus A, Vollmer I, Arriola E: **Activating and resistance mutations of the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene and non-small cell lung cancer: a clinical reality.** *Arch Bronconeumol* 2011, **47**(2):103-105.
38. Rogers KR, Kikawa KD, Mouradian M, Hernandez K, McKinnon KM, Ahwah SM, Pardini RS: **Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor-related signaling by disrupting its lipid raft association.** *Carcinogenesis* 2010, **31**(9):1523-1530.
39. Wu SG, Yang CH, Yu CJ, Lee JH, Hsu YC, Chang YL, Shih JY, Yang PC: **Good response to pemetrexed in patients of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations.** *Lung Cancer* 2011, **72**(3):333-339.
40. Li D, Ambrogio L, Shimamura T, Kubo S, Takahashi M, Chirieac LR, Padera RF, Shapiro GI, Baum A, Himmelsbach F *et al*: **BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models.** *Oncogene* 2008, **27**(34):4702-4711.
41. Matsubara D, Ishikawa S, Sachiko O, Aburatani H, Fukayama M, Niki T: **Co-activation of epidermal growth factor receptor and c-MET defines a distinct subset of lung adenocarcinomas.** *Am J Pathol* 2010, **177**(5):2191-2204.
42. Uramoto H, Shimokawa H, Hanagiri T, Kuwano M, Ono M: **Expression of selected gene for acquired drug resistance to EGFR-TKI in lung adenocarcinoma.** *Lung Cancer* 2011, **73**(3):361-365.
43. Sequist LV: **Second-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer.** *Oncologist* 2007, **12**(3):325-330.
44. Wong KK: **HKI-272 in non small cell lung cancer.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**(15 Pt 2):s4593-4596.
45. Thunnissen FB, Prinsen C, Hol B, Van der Drift M, Vesin A, Brambilla C, Montuenga L, Field JK: **Smoking history and lung carcinoma: KRAS mutation is an early hit in lung adenocarcinoma development.** *Lung Cancer* 2012, **75**(2):156-160.
46. Kakegawa S, Shimizu K, Sugano M, Miyamae Y, Kaira K, Araki T, Nakano T, Kamiyoshihara M, Kawashima O, Takeyoshi I: **Clinicopathological features of lung adenocarcinoma with KRAS mutations.** *Cancer* 2011, **117**(18):4257-4266.
47. de Mello RA, Marques DS, Medeiros R, Araujo AM: **Epidermal growth factor receptor and K-Ras in non-small cell lung cancer-molecular pathways involved and targeted therapies.** *World J Clin Oncol* 2011, **2**(11):367-376.
48. Munfus-McCray D, Harada S, Adams C, Askin F, Clark D, Gabrielson E, Li QK: **EGFR and KRAS mutations in metastatic lung adenocarcinomas.** *Hum Pathol* 2011, **42**(10):1447-1453.
49. Wong DW, Leung EL, Wong SK, Tin VP, Sihoe AD, Cheng LC, Au JS, Chung LP, Wong MP: **A novel KIF5B-ALK variant in nonsmall cell lung cancer.** *Cancer* 2011. 177 : 2709-2718.
50. Just PA, Cazes A, Audebourg A, Cessot A, Pallier K, Danel C, Vacher-Lavenu MC, Laurent-Puig P, Terris B, Blons H: **Histologic subtypes, immunohistochemistry, FISH or molecular**

- screening for the accurate diagnosis of ALK-rearrangement in lung cancer: A comprehensive study of Caucasian non-smokers.** *Lung Cancer* 2011.
51. Buttitta F, Barassi F, Fresu G, Felicioni L, Chella A, Paolizzi D, Lattanzio G, Salvatore S, Camplese PP, Rosini S *et al*: **Mutational analysis of the HER2 gene in lung tumors from Caucasian patients: mutations are mainly present in adenocarcinomas with bronchioloalveolar features.** *Int J Cancer* 2006, **119**(11):2586-2591.
 52. Chaft JE, Arcila ME, Paik PK, Lau C, Riely GJ, Pietanza MC, Zakowski MF, Rusch V, Sima CS, Ladanyi M *et al*: **Coexistence of PIK3CA and Other Oncogene Mutations in Lung Adenocarcinoma-Rationale for Comprehensive Mutation Profiling.** *Mol Cancer Ther* 2012, **11**(2):485-491.
 53. Marks JL, McLellan MD, Zakowski MF, Lash AE, Kasai Y, Broderick S, Sarkaria IS, Pham D, Singh B, Miner TL *et al*: **Mutational analysis of EGFR and related signaling pathway genes in lung adenocarcinomas identifies a novel somatic kinase domain mutation in FGFR4.** *PLoS One* 2007, **2**(5):e426.
 54. Marks JL, Gong Y, Chitale D, Golas B, McLellan MD, Kasai Y, Ding L, Mardis ER, Wilson RK, Solit D *et al*: **Novel MEK1 mutation identified by mutational analysis of epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in lung adenocarcinoma.** *Cancer Res* 2008, **68**(14):5524-5528.
 55. Li C, Fang R, Sun Y, Han X, Li F, Gao B, Iafrate AJ, Liu XY, Pao W, Chen H *et al*: **Spectrum of oncogenic driver mutations in lung adenocarcinomas from East Asian never smokers.** *PLoS One* 2011, **6**(11):e28204.

Figuras:

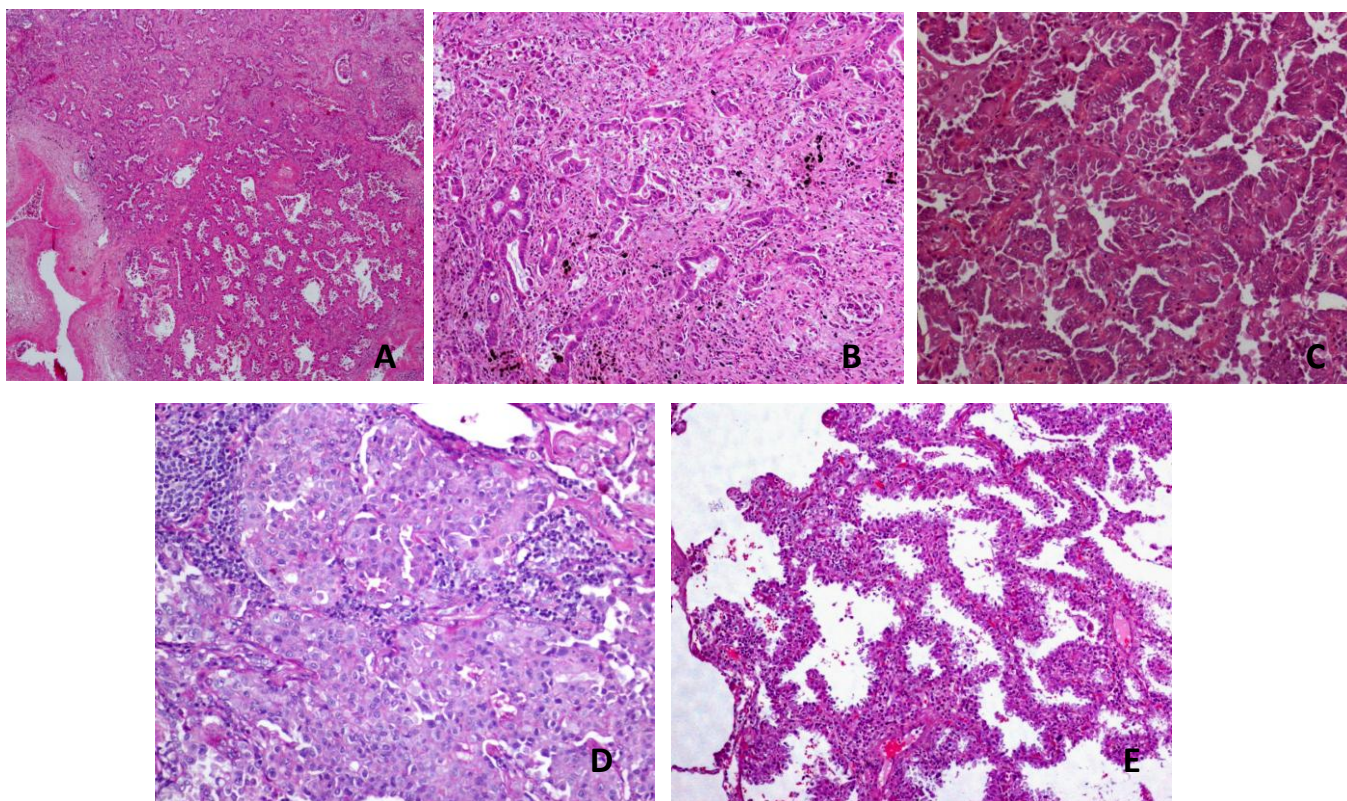


Fig. 1: Padrões histológicos do adenocarcinoma do pulmão: A (HE 40x) – Adenocarcinoma de padrão misto com áreas tubulares e áreas in situ (bronquíolo-alveolares); B HE(40x) Adenocarcinoma de padrão acinar; C (HE40X)-Adenocarcinoma de padrão papilar; D (HE40X)-Adenocarcinoma de padrão sólido; E (HE40x)- Adenocarcinoma in situ (bronquíolo-alveolar)

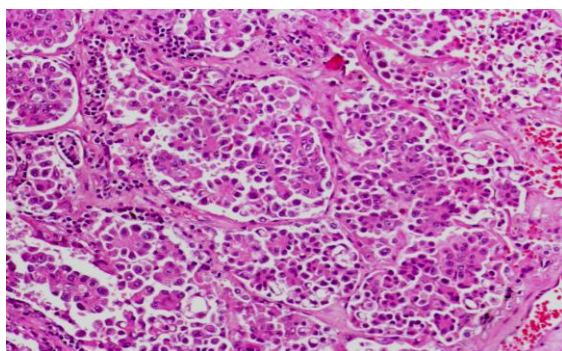


Fig. 2 - (HE 40X)-
Adenocarcinoma
micropapilar

Instruções aos Autores

A *Revista Portuguesa de Pneumologia* considera para publicação trabalhos (artigos originais, de revisão, casos clínicos, cartas ao editor, comentários, etc.) relacionados directa ou indirectamente com o Aparelho Respiratório. As opiniões expressas são da exclusiva responsabilidade dos autores.

Os artigos publicados ficarão propriedade da *Revista Portuguesa de Pneumologia*, não podendo ser reproduzidos, no todo ou em parte, sem autorização do editor.

Todos os manuscritos são avaliados por membros do Corpo Editorial da Revista e a aceitação para publicação dos artigos de investigação original, casos clínicos ou séries de casos que forem considerados adequados, fica dependente do parecer técnico dos revisores. Nesta avaliação, os artigos poderão ser:

- a) aceites sem alterações;
- b) aceites após as modificações propostas e aceites pelos autores;
- c) recusados.

Apenas serão aceites manuscritos contendo material original que não estejam ainda publicados, na íntegra ou em parte (incluindo tabelas e figuras), e que não estejam a ser submetidos para publicação noutros locais. Antes da submissão do manuscrito, os autores têm que assegurar todas as autorizações necessárias para a publicação do material submetido.

Apresentação dos trabalhos - Os textos devem ser escritos em inglês e submetidos electronicamente através da plataforma da Elsevier em <http://www.ees.elsevier.com/rpp/>. Chama-se a atenção que a **transcrição de imagens, quadros ou gráficos de outras publicações, deverá ter a prévia autorização dos respectivos autores** para dar cumprimento às normas de regem os direitos de autor. Deverão ser referenciados, pelos próprios autores, como artigos originais, de revisão, cartas ao editor, ou outros. Todos os artigos originais serão também publicados em português, ficando a respectiva tradução a cargo dos autores do artigo, após a aceitação do mesmo, sendo no final revistos novamente pelo conselho editorial da revista.

Estrutura - Deverá ser adoptado o esquema convencional em que se iniciará cada parte do trabalho numa nova página pela seguinte ordem:

- a) Na primeira página:

- título do trabalho e o nome dos autores com os respectivos títulos académicos e/ou profissionais, os serviços onde foi realizado, os respectivos endereços e o endereço electrónico do(s) autor(es) para contacto. No caso de ser ultrapassado o número de 6 autores, terá de haver uma nota justificativa.

- b) Na(s) página(s) seguinte(s):

- o resumo em inglês que não deverá ultrapassar 250 palavras para os trabalhos originais e de 150 para os casos clínicos;
- as palavras-chave (3 a 10), que servirão de base à indexação do artigo, de acordo com a terminologia do Index Medicus “*Medical Subject Headings*”.

- c) O texto que, no caso dos artigos originais, terá em geral: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusões
- d) Agradecimentos
- f) Bibliografia
- g) Quadros e Figuras.

Autoria – Como referido nos “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals.”, a autoria requer uma contribuição substancial para o manuscrito. É pois necessário especificar na **carta de apresentação** o contributo de cada autor para o trabalho.

Exemplo: *António Costa concebeu o estudo e supervisionou todos os aspectos da sua implementação. José Costa colaborou na concepção do estudo e efectuou a análise dos dados. Manuel Costa efectuou a recolha de dados e colaborou na sua análise. Todos os autores contribuíram para a interpretação dos resultados e revisão dos rascunhos do manuscrito.*

Apresentação dos trabalhos – Todo o manuscrito, incluindo referências, tabelas e legendas de figuras, deve ser redigido a dois espaços, com letra a 12 pontos, e justificado à esquerda. Devem ser numeradas todas as páginas, incluindo a página do título. Devem ser apresentadas margens com 2,5 cm em todo o manuscrito. Devem ser inseridas quebras de página entre cada secção. Nos manuscritos assinados por mais de 6 autores (3 autores no caso das cartas ao editor), tem que ser explicitada a razão de uma autoria tão alargada.

TIPOLOGIA DOS ARTIGOS

Artigos de investigação original - O texto deve ser limitado a 2000 palavras, excluindo referências e tabelas, e organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 4 tabelas e/ou figuras (total). Nos materiais e métodos deverá haver uma referência completa e adequada aos métodos estatísticos usados e os resultados deverão estar suficientemente explícitos.

Artigos de revisão - A *Revista Portuguesa de Pneumologia* publica essencialmente artigos de revisão solicitados pelos editores. Contudo, também serão avaliados artigos de revisão submetidos sem solicitação prévia, preferencialmente revisões sistemáticas (meta-análise). O texto deve ser limitado a 5000 palavras, excluindo referências e tabelas, e apresentar um máximo de 5 tabelas e/ou figuras (total). As revisões sistemáticas devem ser organizadas em introdução, métodos, resultados e discussão.

Publicações breves

Resultados preliminares ou novas descobertas podem ser objecto de publicações breves. O texto deve ser limitado a 1000 palavras, excluindo referências e tabelas, e organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências. As publicações breves devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

Comentários

Comentários, ensaios, análises críticas ou declarações de posição sobre tópicos de interesse na área da saúde, designadamente políticas de saúde e educação médica. O texto deve ser limitado a 900 palavras, excluindo referências e tabelas, e incluir no máximo uma tabela ou figura. Os comentários não devem apresentar resumos. Na maior parte dos casos este tipo de artigo será solicitado pelos editores.

Artigos especiais

Quando se justifique o corpo editorial convidará um ou vários autores para elaborarem um artigo cujo interesse formativo atinja as prioridades da revista e cujo tema não seja contemplado noutra tipologia (por exemplo formação pós-graduada).

Casos clínicos — O texto deve ser limitado a 1200 palavras, excluindo referências e tabelas, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total). Os casos clínicos devem apresentar resumos não estruturados em português e em inglês, com um máximo de 120 palavras cada.

De acordo com o seu interesse e originalidade pode ser incluído no caso clínico um comentário/discussão de um dos editores ou revisor convidado (**Caso clínico com discussão**).

Cartas ao editor — Comentários sucintos a artigos publicados na Revista Portuguesa de Pneumologia, de preferência nos últimos 6 meses, ou relatando de forma muito objectiva os resultados de observação clínica ou investigação original, que não justifiquem um tratamento mais elaborado. O texto deve ser limitado a 400 palavras, excluindo referências e tabelas, e incluir no máximo uma tabela ou figura e até 5 referências. As cartas ao editor não devem apresentar resumos.

Bibliografia — As referências bibliográficas devem ser numeradas por ordem consecutiva da sua primeira citação no texto. Devem ser identificadas no texto com números árabes. As referências devem conter, no caso das revistas, o nome do primeiro autor (apelido e nome), seguido dos restantes, do título do artigo, do nome da publicação e da sua identificação (ano, volume e páginas).

Pode ser encontrada nos “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals” uma descrição pormenorizada do formato dos diferentes tipos de referências, de que se acrescenta um exemplo:

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increase risk for pancreatobiliary disease. Ann Intern Med 1996;124:980-3.

Quadros e figuras — Os quadros e figuras devem ser apresentados em páginas separadas, em condições de reprodução, de acordo com a ordem em que são discutidas

no texto. Devem ser acompanhados da respectiva legenda de modo a serem compreendidas e interpretadas sem recurso ao texto manuscrito. Todos os gráficos deverão ser apresentados através de fotografia do respectivo original. Não devem ser enviados originais de fotografias, ilustrações ou outros materiais como películas de raio-X. As figuras, criadas em computador, ou convertidas em formato electrónico após digitalização, devem ser inseridas no ficheiro do manuscrito. Os custos da publicação das figuras a cores serão suportados pelos autores. Em caso de aceitação do manuscrito, serão solicitadas as figuras nos formatos mais adequados para a produção da revista.

Anexos — Material muito extenso para a publicação com o manuscrito, designadamente tabelas muito extensas ou instrumentos de recolha de dados, poderá, nos casos em que for considerado, ser colocado apenas na página de Internet para consulta pelos interessados (**Material suplementar**).

Considerações éticas e consentimento informado - Os autores devem assegurar que todas as investigações envolvendo seres humanos foram aprovadas por comissões de ética das instituições em que a investigação tenha sido desenvolvida, de acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial (www.wma.net). Na secção de métodos do manuscrito deve ser mencionada esta aprovação e a obtenção de consentimento informado, quando aplicável. Na submissão de casos clínicos deve constar especificamente o consentimento dos doentes em causa.

Conflitos de interesse — Os autores de qualquer manuscrito submetido devem revelar no momento da submissão a existência de conflitos de interesse ou declarar a sua inexistência. Essa informação será mantida confidencial durante a revisão do manuscrito pelos avaliadores externos e não influenciará a decisão editorial mas será publicada se o artigo for aceite.

Modificações e revisões — No caso da aceitação do artigo ser condicionada a modificações, estas devem ser realizadas pelos autores no prazo de quinze dias (no caso de modificações «menor») ou 2 meses (no caso de modificações «maior»). As **provas tipográficas** serão da responsabilidade da Redacção, se os autores não indicarem o contrário. Neste caso elas deverão ser feitas no prazo determinado pela Redacção, em função das necessidades editoriais da Revista. Os autores receberão as provas para publicação em formato PDF para correcção e deverão devolvê-las à redacção da revista num prazo de 48 horas.

SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS

Os manuscritos submetidos à REVISTA PORTUGUESA DE PNEUMOLOGIA devem ser preparados de acordo com as recomendações acima indicadas e devem ser acompanhados de uma **carta de apresentação** («cover letter»). O conselho editorial, ao tomar conhecimento dos manuscritos, enviará uma informação acerca da orientação dada ao referido artigo. Sempre que sejam sugeridas alterações aos manuscritos enviados pelo conselho editorial, os autores deverão enviar a nova versão com a explicação das modificações efectuadas. A correspondência entre os autores e a revista deverá ser efectuada através da Plataforma da Elsevier em <http://www.ees.elsevier.com/rpp/>